

## Marquage chimique à l'oxytétracycline de juvéniles d'holothurie de sable, *Holothuria scabra* – rapport préliminaire

Michelle Simoes<sup>1</sup> et Jens Knauer\*

### Résumé

Dans le cadre d'une expérience préliminaire, nous avons utilisé de l'oxytétracycline, un fluorochrome, pour marquer les spicules dermiques de juvéniles d'*Holothuria scabra*. D'après nos premiers résultats, l'oxytétracycline est un marqueur bien moins efficace que la tétracycline et la calcéine après 1, 6 et 24 heures, dans les mêmes conditions expérimentales : température de l'eau (28 °C), concentration de fluorochrome et durée de la baignade. Le meilleur taux de marquage obtenu avec l'oxytétracycline (18 %) était proche du taux de 15 % obtenu avec la tétracycline après une heure, mais ne correspond qu'à 62 % du taux de marquage de 29 % observé avec la calcéine après une heure de baignade. Par ailleurs, après 24 heures, le taux de marquage des spicules dermiques atteint 28 % avec la tétracycline et 39 % avec la calcéine. Si la totalité des sujets expérimentaux ont subi une importante perte de poids au cours de cette expérience préliminaire, aucune mortalité n'est à signaler. D'après nos résultats, l'oxytétracycline, probablement moins toxique que les autres marqueurs, n'est pas aussi efficace que la tétracycline et la calcéine pour marquer les spicules dermiques des juvéniles de *H. scabra*.

### Introduction

L'expérience a montré que le marquage des spicules dermiques des juvéniles d'holothurie de sable (*Holothuria scabra*) constitue une technique adaptée pour différencier les juvéniles produits en éclosion des populations naturelles. Cette distinction est particulièrement importante à l'heure d'évaluer l'efficacité des programmes de réensemencement et d'aquaculture marine des holothuries (Purcell et al. 2006 ; Purcell et Simutoga 2008 ; Purcell et Blockmans 2009). Le marquage des juvéniles se fait de préférence par baignade : un fluorochrome est ajouté à un bain à la concentration désirée. Pour le marquage des juvéniles de *H. scabra*, l'expérience a révélé que le meilleur compromis entre taux de marquage et survie était obtenu avec un bain de tétracycline ou de calcéine à une concentration de 100 mg L<sup>-1</sup> pendant 24 heures à une température  $\geq 26$  °C (Purcell et Blockmans 2009). Une autre substance de la famille des tétracyclines, le chlorhydrate d'oxytétracycline, a également été utilisée avec succès pour marquer des poissons juvéniles (Secor et al. 1991 ; Kayle 1992 ; Brooks et al. 1994 ; Bumgardner et King 1996 ; Jenkins et al. 2002 ; Butcher et al. 2003 ; Taylor et al. 2005 ; Hutchings et Griffiths 2010) et des ormeaux (Day et al. 1995). L'efficacité de cette substance n'a toutefois pas été testée sur les juvéniles de *H. scabra*.

Nous faisons ici état des résultats de notre expérience préliminaire de marquage à l'oxytétracycline des spicules dermiques des juvéniles de *H. scabra*. En particulier, nous nous sommes penchés sur l'effet de la durée d'immersion sur le taux de marquage. Nous nous sommes limités à ce seul facteur, afin d'éviter les longues manipulations

requis pour faire varier d'autres paramètres, tels que la température et la salinité.

### Méthode et résultats

Les juvéniles de *H. scabra* ont été obtenus par induction de la ponte au Darwin Aquaculture Centre en septembre 2010, en appliquant les méthodes d'Agudo (2006) sur un stock géniteur de Tasmanian Seafoods P/L. Au total, 36 juvéniles (fourchette de poids : 1,5–3 g) ont été sélectionnés de façon aléatoire et transférés dans un bac de préconditionnement d'une contenance de 600 litres. Tous les juvéniles sont restés huit jours dans le bac, où des algues *Spirulina* sp. (Australian Spirulina, ® TAAU Australia P/L, Darwin, Australie) ont été ajoutées tous les deux jours à raison de 5 % de la biomasse totale de *H. scabra*. Le jour précédant le marquage par immersion, aucun aliment n'a été ajouté au bac et les juvéniles ont tous été inspectés pour déterminer leur état de santé selon les méthodes de Purcell et Eeckhaut (2005).

Chacun des 36 juvéniles a été pesé et ils ont été placés 3 par 3 de façon aléatoire dans 12 récipients contenant de l'eau de mer filtrée à 1  $\mu$ m (34 ppt ; 28,0–28,5 °C). De l'oxytétracycline a été injectée dans chaque récipient pour obtenir une concentration finale de 100 mg L<sup>-1</sup> (Purcell et Blockmans 2009). Les récipients ont été placés par groupes de trois dans quatre caisses en polystyrène ventilées et ils ont été protégés de toute perturbation pendant les différentes durées d'immersion étudiées (1, 6, 24, 48 h). À chaque caisse en polystyrène correspondait une durée d'immersion. Après baignade, des lots de trois juvéniles ont été prélevés de chaque récipient et posés

<sup>1</sup> Darwin Aquaculture Centre, Darwin, Australie.

\* Jens.Knauer@nt.gov.au

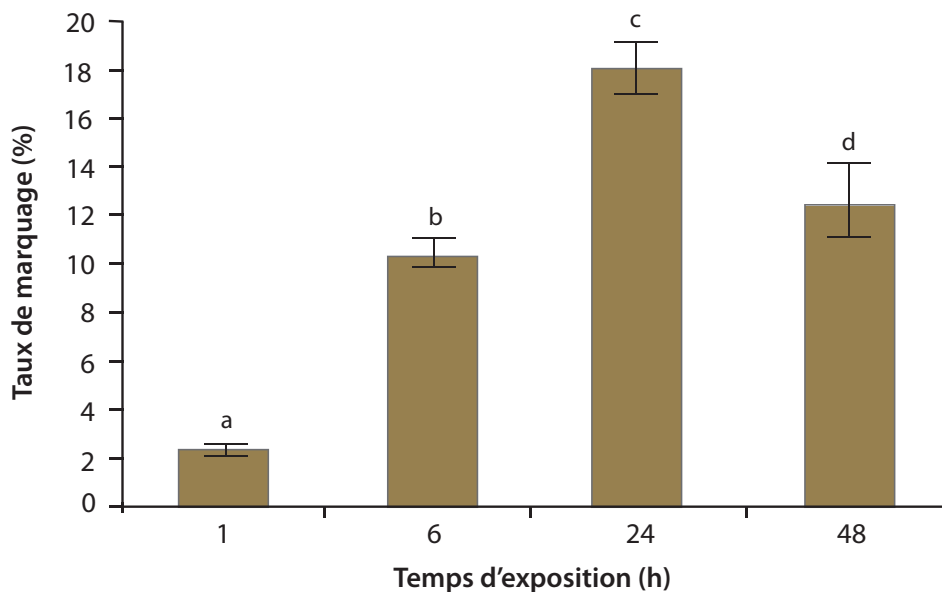
dans douze paniers étiquetés, placés dans le bac de 600 litres. Ils sont alors restés au repos pendant 14 jours. Au cours de cette période, leur état de santé a été contrôlé quotidiennement, des algues *Spirulina* sp. ont été ajoutées tous les deux jours au bac et les excréments ont été siphonnés deux fois par jour.

Les spicules dermiques ont été prélevés et traités selon les méthodes de Purcell et Blockmans (2009). Ils ont ensuite été examinés au microscope à épifluorescence Leica DM 4000 et deux séries de photos ont été prises (avec un appareil Leica DFC 320) pour chaque lame. Chaque série de photos se compose d'une photo sous lumière fluorescente et d'une photo sous lumière naturelle. Le pourcentage de spicules marqués a alors été calculé en divisant le nombre de spicules marqués visibles sur la photo prise sous lumière fluorescente par le nombre de spicules observés sur la photo prise sous lumière naturelle. Le nombre de spicules dénombrés par photo variait de 10 à 167.

Le poids relevé chez les juvéniles de *H. scabra* juste avant leur immersion et après la période de repos de 14 jours est noté dans le tableau 1. Les écarts entre le poids initial des juvéniles soumis aux différentes conditions expérimentales n'étaient pas significatifs. En revanche, la différence entre le poids initial et le poids final des juvéniles soumis à un même traitement était significative, et ce, pour toutes les durées d'immersion. La perte de poids allait de  $0,60 \pm 0,05$  g pour les juvéniles plongés pendant 6 heures, à  $0,73 \pm 0,15$  g pour ceux immergés pendant 24 heures. Toujours pour la perte de poids, aucun écart significatif n'est à signaler entre les groupes soumis aux différentes conditions expérimentales, et on ne relève aucune mortalité. La perte de poids

observée peut s'expliquer par une légère toxicité de l'oxytétracycline et/ou par le stress causé aux animaux lors de leur manipulation, facteur qui sera examiné lors de prochaines études.

Le taux de marquage des spicules est nettement supérieur chez les juvéniles *H. scabra* plongés dans un bain d'oxytétracycline à  $100 \text{ mg L}^{-1}$  pendant 24 heures ( $18,0 \pm 2,2 \%$ ) (figure 1). Ainsi, le taux de marquage à l'oxytétracycline augmente avec la durée de baignation, pour atteindre un plafond à 24 heures, comme il a été montré pour la tétracycline et la calcéine (Purcell et Blockmans 2009). L'allongement de la durée d'immersion à 48 heures s'est soldé par une baisse significative du pourcentage de spicules marqués par rapport au taux à 24 heures (figure 1). Si une perte importante de poids a été constatée après la période de repos de 14 jours (tableau 1) dans l'ensemble des groupes, quelle que soit la durée d'immersion, le taux de marquage n'a baissé que lorsque l'on dépassait 24 heures de baignation. Les bains de tétracycline et de calcéine à  $100 \text{ mg L}^{-1}$  n'ont en revanche aucun effet sur la croissance des juvéniles de *H. scabra*, comparée à celle d'un groupe témoin non marqué (Purcell et Blockmans 2009). Cela dit, les 36 juvéniles marqués à l'oxytétracycline dans notre étude ont tous survécu, tandis qu'une autre étude révèle que sur 108 juvéniles plongés dans des bains de tétracycline ou de calcéine (concentration non précisée), sept sont morts (6 pour la tétracycline et 1 pour la calcéine) (Purcell et Blockmans 2009). Le taux de marquage à l'oxytétracycline est sensiblement inférieur pour une durée d'immersion d'une heure que pour toutes les autres durées d'immersion ( $2,3 \pm 0,4 \%$ ). Aucun écart significatif n'a été relevé entre les taux de marquage à 6 heures ( $10,3 \pm 1,4 \%$ ) et à 48 heures ( $12,5 \pm 3,2 \%$ ).



**Figure 1.** Taux de marquage des spicules des juvéniles d'*Holothuria scabra* plongés dans un bain à l'oxytétracycline pendant 1 à 48 heures. Les valeurs présentées correspondent à la moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 3$ ). Les écarts significatifs sont indiqués par différentes lettres ( $P \leq 0,05$ ).

**Tableau 1.** Poids initial et final des juvéniles d'holothurie de sable, *Holothuria scabra*, marqués à l'oxytétracycline par baignade (jusqu'à 48 h). Les valeurs présentées correspondent à la moyenne  $\pm$  écart-type ( $n = 3$ ). Les écarts significatifs observés dans les fourchettes sont indiqués par un \* ( $P \leq 0,05$ ).

Temps de baignade (h)	Poids initial (g)	Poids final (g)
1	2,30 $\pm$ 0,06	1,63 $\pm$ 0,14*
6	2,23 $\pm$ 0,09	1,61 $\pm$ 0,03*
24	2,23 $\pm$ 0,03	1,53 $\pm$ 0,14*
48	2,00 $\pm$ 0,10	1,36 $\pm$ 0,07*

## Bibliographie

- Agudo N. 2006. Sandfish hatchery techniques. Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR), the Secretariat of the Pacific Community (SPC) and the WorldFish Center. 44 p.
- Brooks R.C., Heidinger R.C. and Kohler C.C. 1994. Mass-marking otoliths of larval and juvenile walleyes by immersion in oxytetracycline, calcein or calcein blue. *North American Journal of Fisheries Management* 14:143–150.
- Bumgardner B.W. and King T.L. 1996. Toxicity of oxytetracycline and calcein to juvenile striped bass. *Transactions of the American Fisheries Society* 125:143–145.
- Butcher A., Mayer D., Willett D., Johnston M. and Smallwood D. 2003. Scale pattern analysis is preferable to OTC marking of otoliths for differentiating between stocked and wild dusky flathead, *Platycephalus fuscus*, and sand whiting, *Sillago ciliata*. *Fisheries Management Ecology* 10:163–172.
- Day R.W., Williams M.C. and Hawkes G.P. 1995. A comparison of fluorochromes for marking abalone shells. *Marine and Freshwater Research* 46:599–605.
- Hutchings K. and Griffiths M.H. 2010. Life-history strategies of *Umbrina robinsoni* (Scaenidae) in warm-temperate and subtropical South African marine reserves. *African Journal of Marine Science* 32:37–53.
- Jenkins W.E., Denson M.R., Bridgman C.B., Collins M.R. and Smith T.I.J. 2002. Retention of oxytetracycline-induced marks on sagittae of red drum. *North American Journal of Fisheries Management* 22:590–594.
- Kayle K. 1992. Use of oxytetracycline to determine the contribution of stocked fingerling walleye. *North American Journal of Fisheries Management* 12:353–355.
- Purcell S.W. and Blockmans B.F. 2009. Effective fluorochrome marking of juvenile sea cucumbers for sea ranching and restocking. *Aquaculture* 296:263–270.
- Purcell S.W. et Eeckhaut I. 2005. Un examen sanitaire externe des holothuries produites en éclosion. *La Bêche-de-mer, Bulletin de la CPS* 22:34–38.
- Purcell S.W. and Simutoga M. 2008. Spatio-temporal and size-dependent variation in the success of releasing cultured sea cucumbers in the wild. *Reviews in Fisheries Science* 16:204–214.
- Purcell S.W., Blockmans B.F. and Nash W.J. 2006. Efficacy of chemical and physical tags for large-scale release of an exploited holothurian. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 334:283–293.
- Secor D.H., White M.G. and Dean J.M. 1991. Immersion marking of larval and juvenile hatchery-produced striped bass with oxytetracycline. *Transactions of the American Fisheries Society* 120:261–266.
- Taylor M., Fielder D. and Suthers I. 2005. Batch marking of otoliths and fin spines to assess the stock enhancement of *Argyrosomus japonicus*. *Journal of Fish Biology* 66:1149–1162.